Utilisation du Coulter Counter

Numéro de protocole	CC 19
Rédacteur	D. Logeart
Validé par	
Date de validation	Fev 2014
Nombre de pages du protocole complet	9

Coulter Counter
Modèle Z2
N° Série : AE04055
N° ID : 839651

Site : www.beckmancoulter.com
Contact: BeckmanCoulter@beckman.com

Nicolas Jan <njan@beckman.com>
Ingenieur Service Clients
Particle analysis & Cellular analysis

BECKMAN COULTER FRANCE

Réactifs :

ACCUVETTE VIAL 20mL PK250	beckmancoulter ref 899366014
ISOTON II 20 LITERS	beckmancoulter ref 8448011

Mode d'emploi simplifié

1. Avant toute utilisation, vérifier que le niveau d'isoton dans flacon diluant est rempli.
2. L'électrode ne doit pas sécher ; toujours la plonger dans l'electrolyte ou eau.
3. Mettre en marche (bouton en haut à droite)
4. Eventuellement RECALIBRER l'appareil (cf procédure 4)
5. PARAMETRER votre appareil avant de compter (cf procédure 1)
6. COMPTER vos cellules (cf procédure 2) ; vérifier vos SEUILS ou ajuster les (cf procédure 3)
7. Lorsque vous avez fini, rincer 2 fois votre tube avec isoton propre et éteindre appareil selon procédure (cf Procédure 5)

1. PARAMETRAGE

Dans un premier, il faut connaître les paramètres de la lignée cellulaire que vous utilisez. Pour cela préparer une solution cellulaire assez concentrée.

1. Presser la touche SET-UP ; S1 apparaît.

2. SELECT UNITS : choisisser l'unité de la taille de vos cellules (généralement µm)

3. SET Lower Size Tl et Lower Size Tu : entrer les valeurs de seuils haut et bas
   ATTENTION : le rapport entre seuil haut et seuil bas ne doit pas excéder 3 :1 en diamètre (27 :1 en volume)
   (si la gamme d'analyse est trop large, un message d'erreur s'affichera au comptage ! !)

4. COUNT MODE : choisisser si voulez compter Above Tl ; Between ou Above Tu

5. Presser Set-up; le menu S2 apparaît : vérifier le diamètre de l'orifice, le volume aspiré ; Measure aperture et Optimize size doivent être à YES

6. Presser la touche OUTPUT : menu d'affichage et de paramétrages des résultats après analyse

7. RESULT TYPE : Choisir Count (nombres de particules comptées dans la gamme sélectionnée et dans le volume aspiré) ou Concentration (comptage rapporté au volume d'aspiration (metered volume) et corrigé du facteur de dilution)

8. DILUTION FACTOR : entrer votre facteur de dilution si vous compter en concentration

2. COMPTAGE DE CELLULES

- Plonger l'électrode dans votre solution de cellules puis appuyer sur START ; le menu A2 apparaît

- Des messages d'état sont affichés sur l'écran: ' BUILDING VACUUM'.
  PREPARE TO COUNT ' ensuite ' COUNTING '.

DESCRIPTION DU MENU DE COMPTAGE:

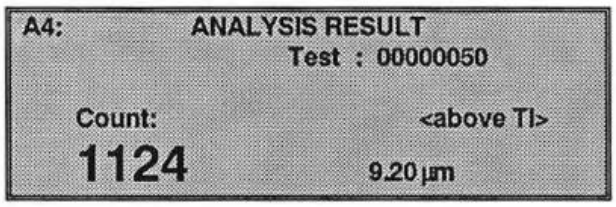
Test	Le numéro de test de l'analyse
Count	Comptage en temps réel
Above Ti	Valeur du seuil bas au-delà duquel les particules sont comptées
Above Tu	Valeur du seuil haut au delà duquel les particules sont comptées
Between Ti - Tu	(Modèle ZI à double seuil).Nombre de particules comptées entre les deux seuils. Mode de comptage sélectionné dans le menu SI ou dans le menu Output). TI représente le seuil bas et Tu le seuil haut
Conc	Indicateur de concentration. Il doit indiquer entre 0 et 20% de coincidence. Pour une analyse optimale, l'indicateur doit afficher entre 5% et 10%.
Pulse display	• Affichage des impulsions • Affiche l'amplitude d'une série d'impulsions prises au hasard sur une échelle de 0 à 100 unités. • Le niveau du bruit de fond est affiché. • Des lignes horizontales montrent la position des seuils hauts" Upper Size Tu " et bas "Lower Size TI ". • Le nombre d'impulsions indique la concentration. • La hauteur de l'impulsion est proportionnelle au volume de la particule analysée.

Si la touche STOP est pressée en cours de cycle, l'analyse est interrompue

RESULTATS

1. Pendant le comptage , le menu A2 apparaît. Vous pouvez suivre l'indicateur de concentration et l'affichage des impulsions

2. Lorsque le comptage est terminé, le menu A4 apparaît. Les résultats sont exprimés en Counts ou en Concentration.



3. Presser la touche OUTPUT, l'histogramme du nombre de particules en fonction de leur taille apparaît, ainsi que les seuils.
   VERIFIER QUE LES SEUILS SONT BIEN SITUES
   (votre comptage tient compte de l'ensemble de votre population cellulaire sans compter les débris),
   SINON RE-AJUSTER LES SEUILS (cf tableau plus bas).

4. Garder les valeurs seuils pour votre population cellulaire, puis procéder la même façon pour tous vos comptages.

5. Lorsque vous avez terminé
   Rincer à l'isoton
   Mettre l'electrode dans eau permutée (cf entretien)

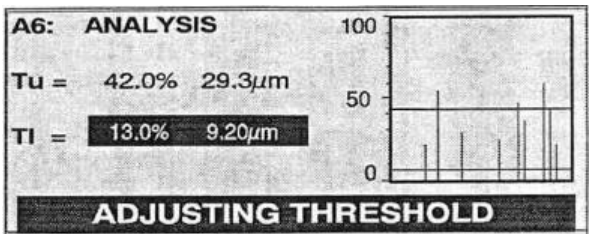
6. Eteindre l'appareil
7. Vider le flacon de déchets

3. Changement des réglages en cours d'analyse

1. L'opérateur peut bouger les seuils en cours d'analyse et de comptage en pressant les touches ^ ou v . Les résultats de l'analyse sont alors invalides et il faut refaire une analyse en fonction des nouveaux seuils.

2. A partir du menu de comptage A2, lorsque le système compte et affiche le message 'COUNTING' , presser les touches ^ or v .

L'écran A6 apparait.



Tl = 13.0% *9.2 µm* impulsions — Le seuil bas est à 13.0% de la pleine échelle des

Les 13.0% représentent un diamètre de 9.2 µm.

Tu = 42.0% *29.3 µm* - impulsions. — Le seuil haut est à 42.0% de la pleine échelle des

(Modèle Zl à double seuil) — Les 42.0% représentent une taille de 29.3 µm

3. Le seuil est ajusté à l'aide des touches ^ et v.

Pour le Zl à double seuils, commuter d'un seuil à l'autre en utilisant le curseur < et > , le seuil sélectionné apparait en surbrillance.

La ligne horizontale indiquant sa position bouge au fur et à mesure du changement de la valeur. Une fois que les seuils sont placés à la valeur choisie, presser la touche START. Le comptage redémarre en fonction des nouveaux réglages.

Type cellulaire	Unité	Lower size (Tl)	Upper size (Tu)	Count mode
hMSC	µm	8	18	Above Tl
C3H10T1/2		7	18	Above Tl
MSC rat		8.5	21	Above Tl

4. CALIBRATION

A faire 1X / mois

Chaque tube à orifice possède une constante de calibration unique, qui est fonction de ses caractéristiques. Il est recommandé de calibrer les tubes à orifice au moins une fois par mois, afin de tenir compte de certaines variations du système. La calibration doit être réalisée à partir d'un étalon de taille parfaitement connue, comme les Latex Coulter pour les applications non biologiques ou un étalon de volume moyen cellulaire parfaitement connu pour les applications biologiques. La procédure de calibration est entièrement automatique.

Avant de réaliser la procédure vérifier que

- l'instrument est mis sous tension,
- le tube à orifice adéquat est sélectionné
- le système est amorcé en électrolyte.

Préparation de l'étalon

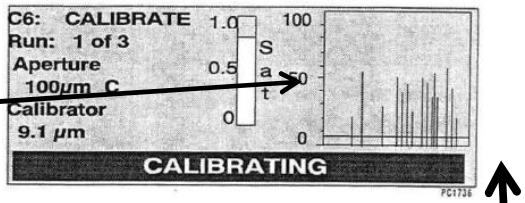
1. Choisir un étalon dont le diamètre équivalant soit compris entre 5 et 20% du diamètre du tube à orifice (notre tube = 100µm).
2. Préparer la suspension contenant l'étalon : Préparer 1 cuvette contenant 20 ml d'isoton + 8 gouttes de billes de Latex calibrées
3. Placer un bécher contenant l'étalon sur le plateau porte échantillon et régler la hauteur de ce dernier de façon à ce que l'électrode, l'orifice du tube et l'agitateur soient immergés.
4. Fermer la porte.

Préparation de l'instrument

5. Presser 2 fois la touche SET-UP (vous êtes sur le menu S2)
6. Select aperture Vérifier le diamètre du tube à orifice = 100 µm
7. Metered volume : Le volume d'aspiration est généralement fixé à 0.5 (ml)
8. Presser la touche CAL
9. Select units : Choisisser l'unité de l'étalon (µm ou fl) (généralement en µm)
10. Calibration size : Entrer la valeur du diamètre des billes de latex utilisées (indiquée sur la feuille jointe aux billes)
11. Measure aperture : doit être indexé YES
12. Presser la touche START ; le menu C4 apparaît puis C3.
13. Presser à nouveau la touche START ; le menu C6 apparaît

SAT : L'indicateur de concentration.

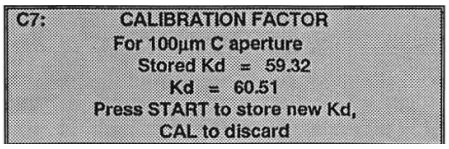
- Pour éviter un nombre de cycles de calibration trop important et une concentration trop forte, l'indicateur doit afficher entre 0,3 et 0,7.
- Si la concentration est trop faible, le message 'LOW CONCENTRATION' est affiché.
- La précision de la calibration n'est pas affectée par une concentration trop faible; cependant, le temps d'analyse et le volume de comptage requis sont trop importants.
- La précision de la calibration est incorrecte si la concentration est trop importante > 0,7.



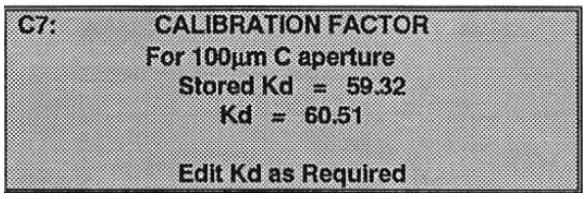
PULSE DISPLAY

- Affichage des impulsions.
- Affichage de l'amplitude d'une série d'impulsions prises au hasard selon une échelle de 0 à 100 unités.
- La hauteur de chaque impulsion est proportionnelle au volume et le nombre d'impulsions affichées reflète la concentration.

14. A la fin de la procédure de calibration, la nouvelle constante KD est affichée pour le tube à orifice. Presser sur START pour valider la nouvelle valeur.



15. Le menu C7 indique les nouveaux paramètres



5. PROCEDURE D'ARRET ET ENTRETIEN

- Si arrêt pour une période courte :
  Placer un bécher rempli d'isoton ou d'eau distillée sur le plateau porte échantillon, vérifier que l'électrode, le tube à orifice sont immergés dans le bécher et éteindre l'appareil
- Si arrêt pour une période plus longue (> 2 semaines) , il est conseillé de laisser l'électrode et le tube à orifice dans de l'eau déionisée afin d'éviter le dépôt de cristaux d'isoton dans le tube à orifice.
- 1 Fois par semaine nettoyer avec du CLENZ (solution bleue) : remplir une cuvette de clenz et mettre le tube de diluant dans la bouteille de CLENZ et effectuer un FILL SYSTEM (Mode FUNCTIONS)
  1 fois par mois : Même procédure avec de l'eau déionisée

- FILL SYSTEM :
  - A faire au démarrage
  - Pour nettoyer en fin de service
  - A utiliser avec Clenz 1X / semaine

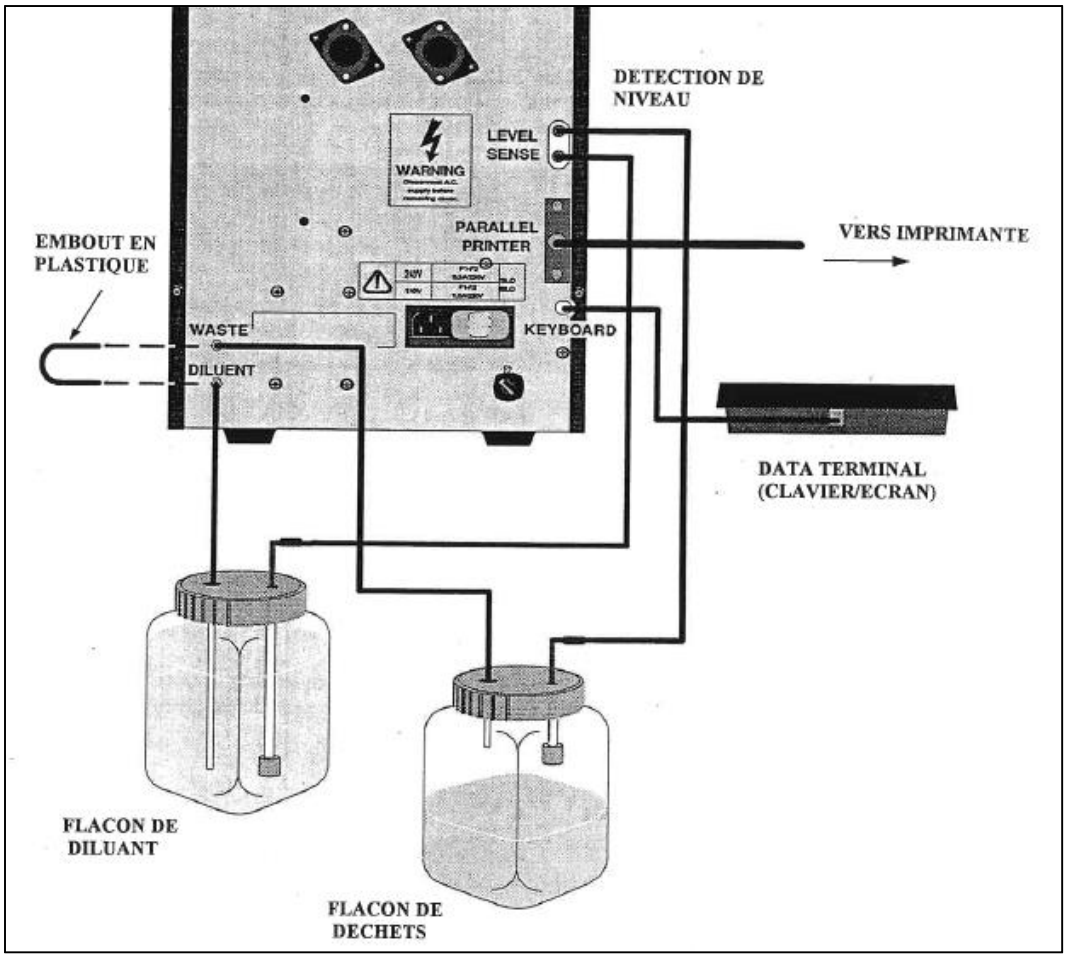
  1. Presser la touche FUNCTIONS pour accéder au menu suivant:
     F1: INSTRUMENT FUNCTIONS.
  2. Utiliser les touches > et < pour faire apparaitre et sélectionner fonction FILL SYSTEM
  3. Presser la touche START pour exécuter .

AUTRES FUNCTIONS DU MENU

Prime Aperture	Remplissage du tube à orifice. A utiliser chaque fois qu'il faut remplir uniquement le tube à orifice avec de l'électrolyte. Le reste du système doit être rempli de diluant
Fill System	Remplissage du système entièrement avec du diluant. A utiliser à chaque installation ou lorsque le système hydraulique a été entièrement vidé pour un changement d'électrolyte.(Tl y a une purge des bulles d'air).
Drain Aperture	Vidange le système. Vide et désamorce entièrement le système. A utiliser lors d'un changement de diluant. Le tuyau d'alimentation en électrolyte relié au flacon de diluant doit être placé sur le flacon de déchets pour cette opération. Ne pas oublier de le replacer dans sa position initiale après l'opération.
Flush Aperture	Applique un contre courant au niveau de l'orifice pour chasser les particules et les bulles d'air de l'orifice.
Vent	Mise à la pression atmosphérique de la partie interne du tube à orifice. Tl y a une mise à l'atmosphère automatique, lors des procédures de vidange de l'orifice ou du système hydraulique.
User Testing	Ces fonctions sont utilisées pour tester le système: • Software level (niveau de révision du programme) • Keyboard (clavier) • Display (écran)

6. MENUS ECRAN

SET-UP	Ces menus SET UP permettent de configurer le système et modifier les paramètres avant l'analyse. SI: SETUP- ENTER SIZE DATA S2: SETUP- ENTER ANALYSIS DATA S3: SETUP- INSTRUMENT SETTINGS S4: SETUP- APERTURE SELECTION
CAL	Les menus de calibration permettent de définir des paramètres nécessaires à la procédure de calibration de l'instrument Cl: CALIBRATION C2: CALIBRATION FACTOR C3: CAL- INSTRUMENT SETTINGS
OUTPUT	Le menu Analysis permet de configurer la sortie ainsi que l'impression automatique des résultats . AI: ANALYSIS - OUTPUT FORMAT A4: ANALYSIS RESULT
UNBLOCK	Presser la touche UNBLOCK pour déboucher l'orifice dans le cas d'un bouchage éventuel. Cette fonction inverse le flux de passage à travers l'orifice pour chasser les débris .
PRINT	Presser la touche PRINT pour imprimer manuellement un résultat.
FUNCTIONS	Cf procédure entretien



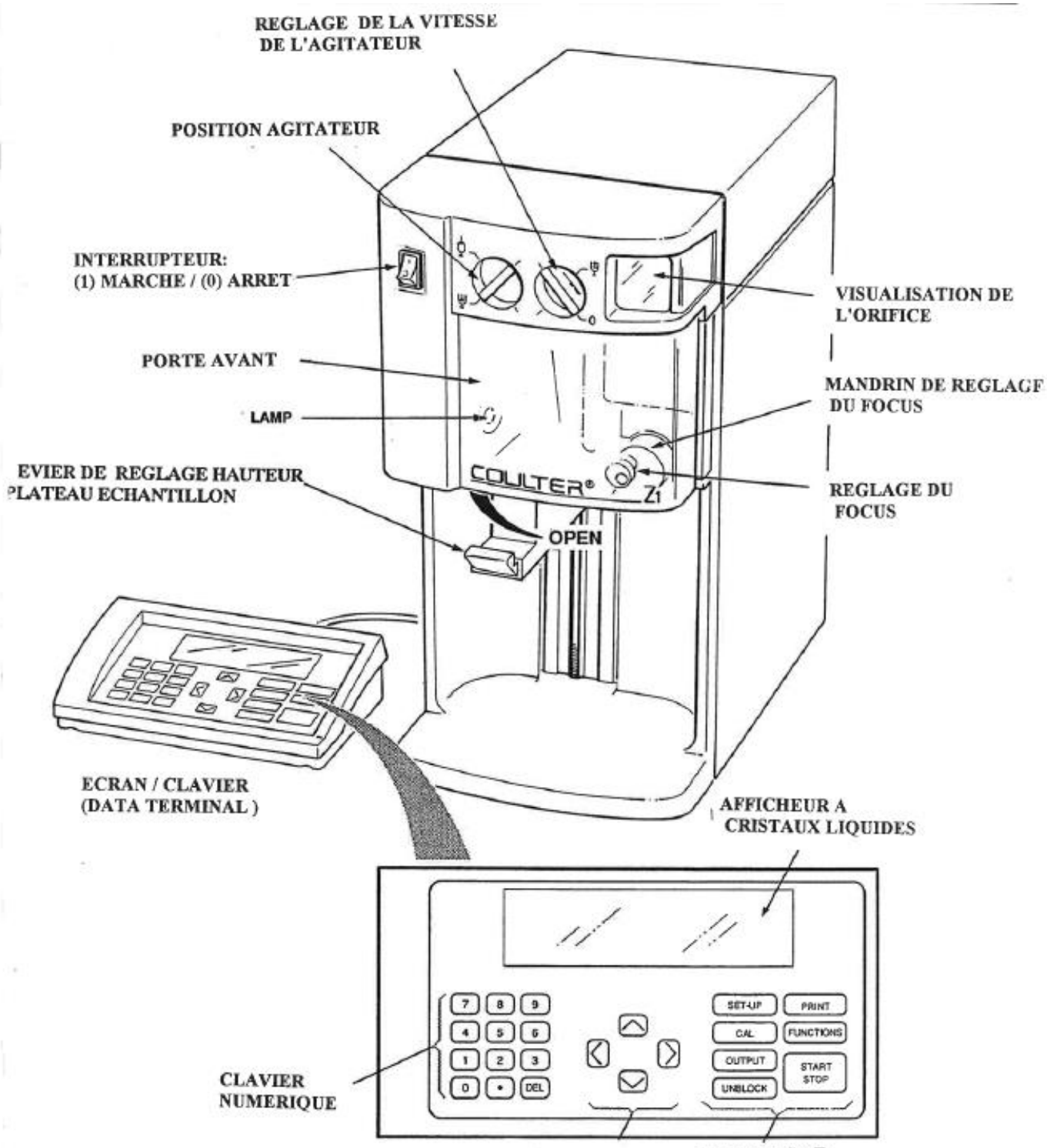


Figure 1-1: COULTER Z1 FACE AVANT